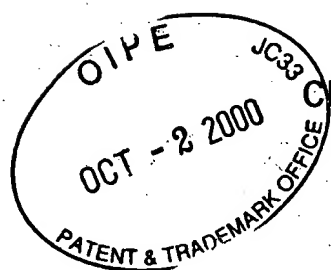




BREVET D'INVENTION



CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

BEST AVAILABLE COPY

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 27 JUIL. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**DUPLICATA
DE LA REQUETE**

**DEMANDE DE
(voir case cochée)**

a	<input checked="" type="checkbox"/> PROVIENANT D'UN
b	<input type="checkbox"/> CERTIFICAT D'UTILITÉ
c	<input type="checkbox"/> DEMANDE DIVISIONNAIRE
d	<input type="checkbox"/> TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

Pour c et d, précisez Nature, N° et date de la
demande initiale

2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT
L'ÉTABLISSEMENT DIFFÈRE
DE L'AVIS DOCUMENTAIRE

☐ OUI
☒ NON

SI L'OPTION CHOISIE EST NON ET
SI LE DEMANDEUR EST UNE
PERSONNE PHYSIQUE IL
REQUIERT LE PAIEMENT
ÉCHELONNÉ DE LA RÉDUCTION
D'AVIS DOCUMENTAIRE

☐ OUI
☐ NON

NATURE NUMERO DATE DE LA DEMANDE INITIALE

DATE DE REMISE DES PIÈCES

27/9/91

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

81 11947

DATE DE DÉPÔT

27 SEP. 1991

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

75

4 DATE DU POUVOIR GÉNÉRAL

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

B1736 CDM

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

47.42.82.82.

7 TITRE DE L'INVENTION

**VECTEURS RECOMBINANTS D'ORIGINE VIRALE, LEUR PROCÉDE D'OBTENTION
ET LEUR UTILISATION POUR L'EXPRESSION DE POLYPEPTIDES DANS DES
CELLULES MUSCULAIRES.**

8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

N° SIREN LE CAS ÉCHÉANT

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Etablissement public

9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

15, Quai Anatole France
75007 PARIS

PAYS

FRANCE

10 NATIONALITÉ(S)

FRANCAISE

11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE
INVENTEUR

☐ OUI

Si la réponse est non voir notice explicative

☒ NON

12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE
PHYSIQUE NON IMPOSABLE, IL
REQUIERT-IL OU A REQUIS LA RÉDUCTION
DES REDEVANCES

☐ OUI

☐ NON

DE DÉPÔT REDEVANCES VERSÉES

D'AVIS DOCUMENTAIRE

DE REVENDICATION DE PRIORITÉ

DE REVENDICATION (à partir de la 11e)

13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ PAYS ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMERO

14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES A LA
PRÉSENTE DEMANDE

N°

N°

N°

N°

15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
NOM ET QUALITÉ DU SIGNATAIRE

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ A LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE A L'INPI

REST AVAILABLE COPY

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

[illegible]

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° d'enregistrement national

91 11947

Titre de l'invention :

**VECTEURS RECOMBINANTS D'ORIGINE VIRALE, LEUR PROCÉDE D'OBTENTION
ET LEUR UTILISATION POUR L'EXPRESSION DE POLYPEPTIDES DANS DES
CELLULES MUSCULAIRES.**

Le (s) soussigné (s)

**ERNEST GUTMANN -
YVES PLASSERAUD S.A.
67, bld. Haussmann
75008 PARIS (France)**

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (nom, prénoms, adresse)

**1) PERRICAUDET Michel
20 Résidence du Moulin
28150 OUARVILLE (France)**

**2) BRIAND Pascale
10 Rue du Docteur Roux
75015 PARIS (France)**

**3) STRATFORD-PERRICAUDET Leslie
20 Résidence du Moulin
28150 OUARVILLE (France)**

Date et **27 Septembre 1991**
signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

**ERNEST GUTMANN -
YVES PLASSERAUD S.A.**

VECTEURS RECOMBINANTS D'ORIGINE VIRALE, LEUR PROCÉDE D'OBTENTION ET LEUR UTILISATION POUR L'EXPRESSION DE POLYPEPTIDES DANS DES CELLULES MUSCULAIRES.

L'invention concerne des vecteurs recombinants d'origine virale comportant une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide déterminé, et leur utilisation pour l'expression de ce polypeptide dans des cellules musculaires. L'invention vise également un procédé d'obtention de ces vecteurs, ainsi que leurs applications, notamment en tant que médicaments dans le domaine des pathologies musculaires.

Le problème, non résolu jusqu'à maintenant, de la diffusion directe d'un gène vers un tissu spécifique, fait obstacle au développement de la thérapie génique dans le domaine des maladies musculaires.

Les diverses tentatives de modification du tissu musculaire réalisées jusqu'à ce jour sont principalement celle de la fusion de cellules musculaires avec un muscle hôte (Salminen, A., et al., Hum. Gene Ther. 2, 15-26 (1991); Partridge, T.A., et al., Nature 337, 176-179 (1989)), et celle procédant par injection d'ADN directement dans les muscles (Wolff, J.A. et al. Science 247, 1465-1468 (1991); Acsadi, G., New Biol. 3, 71-81 (1991)).

La méthode procédant par fusion, chez des souris, de précurseurs de cellules musculaires provenant d'un donneur normal, avec des fibres musculaires d'un hôte (Partridge, T.A., et al. cité ci-dessus) a été réalisée avec succès et cette thérapie cellulaire a fait l'objet d'essais préliminaires chez des enfants. Toutefois, cette approche semble présenter trop d'inconvénients pour être applicable au traitement de pathologies musculaires. En effet, les capacités de migration de ces précurseurs de cellules étant

réduites à quelques millimètres, l'implantation cellulaire de ces derniers nécessiterait des millions d'injections pendant des heures d'anesthésie. De manière inévitable, des problèmes immunologiques, conduisant à des phénomènes de rejet, risqueraient d'apparaître, comme dans le cas de nombreuses greffes. De plus le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) nécessite non seulement d'atteindre les muscles du squelette, mais également les cellules myocardiques; on imagine aisément les difficultés susceptibles d'être rencontrées pour implanter des précurseurs de cellules musculaires dans le myocarde. La thérapie cellulaire semble par conséquent peu appropriée pour le traitement de cellules malades présentant une telle dissémination dans l'organisme.

La thérapie génique par introduction directe in vivo d'acides nucléiques à l'intérieur d'organes, est une méthode attrayante en raison de sa simplicité, mais dont le développement se heurte à un certain nombre d'obstacles. En particulier, l'expression de gènes dans les muscles reste localisée au point d'injection (Wolff, J.A., et al. cité ci-dessus) et semble être assez limitée dans le temps, particulièrement dans le muscle cardiaque (Acsadi, G. et al., cité ci-dessus).

Le but de la présente invention est précisément de permettre l'introduction d'un très grand nombre d'acides nucléiques dans un nombre important (jusqu'à 50 % et plus) de cellules musculaires d'un organisme humain ou animal, que ces cellules musculaires soient celles des muscles du squelette ou encore celles du myocarde.

La présente invention a plus particulièrement pour but de permettre l'acheminement de ces acides nucléiques vers les cellules musculaires cibles par la circulation sanguine, tout en protégeant ces acides

BEST AVAILABLE COPY

nucléiques de l'agression de divers constituants sanguins.

Un autre but de la présente invention est de mettre à la disposition du public des compositions pharmaceutiques permettant le traitement des maladies musculaires, et plus particulièrement des pathologies génétiques du système musculaire, ou encore de pathologies dont la localisation dans l'organisme les rendent accessibles aux produits de l'expression des acides nucléiques sus-mentionnés, ces produits étant secrétés par lesdites cellules musculaires.

La présente invention découle de la découverte faite par les inventeurs, du fait que l'on retrouve l'activité β -galactosidase dans de nombreux tissus après injection à des souris de vecteurs recombinants d'origine virale, plus particulièrement d'adénovirus, dans le génome desquels a été inséré le gène codant pour la β -galactosidase. Parmi ces tissus, on peut citer les poumons, le foie, l'intestin, le coeur et les muscles du squelette. L'expression du gène de la β -galactosidase est constante dans le temps, puisque la proportion des cellules de couleur bleue (coloration obtenue à la suite de l'expression de ce gène) dans le tissu musculaire est à peu près équivalente d'un mois à un autre.

La figure 1 représente un exemple de construction d'un vecteur recombinant selon l'invention et correspondant à l'adénovirus de type Ad5 dans le génome duquel est inséré le gène de la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur RSV.

La présente invention a pour objet l'utilisation de vecteurs recombinants d'origine virale, non répliquables, et susceptibles d'être reconnus par les récepteurs de cellules musculaires, humaines ou animales, infectables par ces virus, ces vecteurs étant en outre modifiés par un acide nucléique d'insertion contenant une séquence nucléotidique

codant pour une séquence polypeptidique dont l'expression dans lesdites cellules musculaires est recherchée, cette séquence étant sous le contrôle d'un promoteur reconnu par les polymérases de ces cellules, pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement de pathologies affectant les cellules musculaires ou de pathologies dont la localisation dans l'organisme les rendent accessibles aux produits de l'expression de la séquence nucléotidique sus-mentionnée et secrétés par lesdites cellules musculaires.

Les adénovirus, notamment les adénovirus humains de type 2 ou 5 représentent des vecteurs particulièrement préférés dans le cadre de la présente invention, en raison notamment de la grande taille du fragment d'ADN étranger qu'il est possible d'insérer dans le génome de ces virus.

Avantageusement, l'acide nucléique d'insertion sus-mentionné est compris dans un génome défectif d'adénovirus, ce génome étant dépourvu de séquences essentielles nécessaires à la répllication de ces adénovirus, et plus particulièrement des transactivateurs EA et EB; ce génome comprend néanmoins préférentiellement l'ensemble de celles des séquences essentielles nécessaires à l'encapsidation de ces adénovirus.

La quantité de vecteurs administrée dans l'organisme est avantageusement choisie de manière à déborder le système immunitaire de l'organisme dans lequel ils sont injectés.

Avantageusement la voie d'administration choisie dans le cadre de la présente invention est la voie intravein use.

Parmi les pathologies affectant des cellules musculaires sus-mentionnées, on peut citer des pathologies génétiques telles que la dystrophie musculaire.

A ce titre l'acide nucléique inséré dans le génome du vecteur viral, et dont est recherchée la diffusion dans la masse musculaire, comprend une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide susceptible de traiter la pathologie en question, et plus particulièrement de jouer le rôle dans la cellule musculaire du polypeptide normalement présent dans une cellule saine, mais dont la déficience est due soit à une production anormalement faible, voire nulle, de ce polypeptide, soit à une erreur dans sa séquence en acides aminés résultant d'anomalies d'ordre génétique dans sa séquence nucléotidique codante.

Des vecteurs, selon l'invention, utilisés pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement de la dystrophie musculaire, sont plus particulièrement caractérisés en ce que l'acide nucléique d'insertion est constitué de tout ou partie d'un gène sain de la dystrophine. L'introduction du gène entier de la dystrophine, ou encore de toute partie de ce gène codant pour un polypeptide conservant une activité comparable à celle de la protéine entière, peut être réalisée suivant une méthode identique à celle décrite ci-après pour l'introduction du gène de la β -galactosidase.

A titre d'exemple de pathologies autres que les pathologies musculaires, susceptibles d'être traitées dans le cadre de la présente invention, on peut citer les thromboses à l'origine des infarctus ou encore des phlébites.

Des vecteurs selon l'invention utilisés pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement des thromboses et à la prévention des infarctus et des phlébites, sont plus particulièrement caractérisés en ce que l'acide nucléique d'insertion comprend une séquence nucléotidique codant pour une substance thrombolytique. Cette dernière séquence est avantageusement précédée d'une séquence signal codant

pour un peptide, signal assurant la sécrétion de la substance thrombolytique hors de la cellule musculaire.

L'invention vise également tout vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il est constitué du génome défectif d'un adénovirus, comprenant néanmoins l'ensemble de celles des séquences essentielles nécessaires à l'encapsidation de cet adénovirus, et dans lequel est inséré un acide nucléique recombinant dont est recherchée la diffusion dans la masse musculaire, cet acide nucléique étant placé sous le contrôle d'un promoteur susceptible d'être reconnu par les polymérases des cellules musculaires, notamment le promoteur fort de la région précocée E1A du génome des adénovirus.

Un vecteur recombinant préféré de l'invention est caractérisé en ce que cet acide nucléique recombinant est constitué de tout ou partie du gène de la dystrophine.

L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant un ou plusieurs vecteurs recombinants tels que décrits ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

L'invention a également pour objet un procédé d'obtention des vecteurs recombinants décrits ci-dessus qui comprend après l'étape de construction proprement dite de ces vecteurs par introduction de l'acide nucléique d'insertion dans leur génome, une étape de transformation de lignées cellulaires transformables d'eucaryotes supérieurs (notamment d'origine humaine ou animale) comportant elles-mêmes une séquence distincte de nucléotides apte à compléter la partie du génome de l'adénovirus essentielle pour la répllication de ce dernier et dont le susdit vecteur est dépourvu, ladite séquence

distincte étant de préférence incorporée au génome des cellules de ladite lignée cellulaire.

A titre d'exemple préféré de telles lignées cellulaires, on mentionnera la lignée 293, lignée de rein embryonnaire humain qui contient, intégrés dans son génome, les onze premiers pourcents de l'extrémité gauche du génome d'un Ad5. Ceux-ci permettent de compléter des virus recombinants défectifs qui portent des délétions de cette région. Un tel procédé d'obtention est plus particulièrement décrit dans la demande de brevet européen n° 0 185 573 du 20/11/85.

Après transformation de ces lignées cellulaires, les vecteurs qui se sont ainsi multipliés sont récupérés et purifiés.

La présente invention sera plus particulièrement illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de la construction d'adénovirus vecteurs recombinants comportant le gène codant pour la β -galactosidase, et des propriétés de cet adénovirus vecteur.

1. Construction de l'adénovirus recombinant, Ad-RSV- β gal, par recombinaison in vivo.

Cet adénovirus recombinant a été construit par recombinaison homologue entre un plasmide approprié et le génome de l'adénovirus de type 5 (Ad5). Dans cette construction, le gène de la β -galactosidase est placé sous le contrôle du promoteur RSV (Rous Sarcoma Virus). Le plasmide pAdRSV β gal utilisé contient le segment PvuII de l'extrémité gauche de l'Ad5 (segment situé entre les positions 0 et 1,3 du plasmide sur la figure 1) comprenant la répétition terminale intervertie, l'origine de répllication, des signaux d'encapsidation, et l'amplificateur Ela. Ce fragment est suivi par un gène nls lacZ (décrit dans Bonnerot, C. et al., Proc. natn. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 6795-6799) codant pour la β -galactosidase, et par un

ST AVAILABLE COPY

fragment de l'adénovirus Ad5 situé entre les positions 9,4 et 17 du plasmide de la figure 1.

Les valeurs des positions 1,3, 9,4 et 17 indiquées ci-dessus sont des unités indiquant le nombre de paires de base comprises à l'intérieur de ces fragments, une unité représentant 360 paires de base.

La séquence d'Ad5 située entre les positions 9,4 et 17 sus-mentionnées permet la recombinaison avec l'adénovirus dl324 traité par l'enzyme de restriction ClaI (correspondant à un mutant de délétion E3; la délétion étant effectuée entre les positions 78,4 et 84,3 du génome de l'adénovirus représenté sur la figure 1), après transfection de cellules 293 (cellules embryonnaires humaines de rein transformées par l'adénovirus et mentionnées ci-dessus) afin de générer le vecteur recombinant Ad-RSV- β gal. Le gène nls lacZ est contrôlé par le promoteur RSV LTR et possède le signal de polyadénylation du virus SV40. Le virus recombinant ainsi obtenu est incapable de se répliquer en raison de la délétion des gènes E1.

2. Etude du transfert du gène par l'intermédiaire de l'adénovirus aux organes de souris.

Des souris Balb/C âgées de 4 jours ont subi une injection intra-veineuse de 20-40 microlitres d'adénovirus recombinants hautement purifiés, Ad-RSV- β gal (10^9 unités formant des plages : UFP/ml) les organes ont été prélevés 15 jours après injection et traités avec du paraformaldéhyde 4% dans un tampon phosphate pendant 30 minutes. Après rinçage les organes ont été incubés pendant une nuit à 30°C dans une solution X-gal. Les organes entiers ont ensuite été congelés et préparés de manière appropriée pour effectuer des cryosections (de 10 micromètres d'épaisseur), sections qui ont été colorées à l'aide d'hématoxyline et d'éosine.

BEST AVAILABLE COPY

La mise en évidence par coloration histochimique de la manière indiquée ci-dessus de l'activité β -galactosidase sur les sections effectuées indique la présence dans les cellules des organes prélevés du gène inséré dans l'adénovirus vecteur.

L'examen macroscopique du coeur ainsi que des muscles du squelette prélevés sur ces souris traitées, révèle la grande efficacité avec laquelle a été effectué ce transfert de gène après seulement une injection de l'adénovirus recombinant. L'intérêt du choix de la voie intraveineuse réside dans le fait que le vecteur viral n'est pas concentré dans une zone quelconque du tissu musculaire mais au contraire qu'il est favorablement dispersé dans l'ensemble de la masse musculaire. La coloration histochimique permet d'estimer que le nombre de cellules transformées atteint dans certaines zones 50 % du nombre de cellules musculaires présentes dans cette zone.

L'expression de la β -galactosidase dans le myocarde ainsi que dans les muscles du squelette est parfaitement stable. Des colorations positives ont pu être observées 15, 33, 55, 66, 90, 127 et 150 jours après l'injection de l'adénovirus recombinant. L'expression du gène semble constante en fonction du temps, puisque la proportion de cellules bleues dans les tissus musculaires semblent à peu près équivalente d'un mois à l'autre.

L'analyse de fibres musculaires isolées révèle qu'une seule fibre est susceptible de présenter de nombreux "centres d'expression".

Des analyses par immunotransfert (Southern) réalisées à partir du coeur d'une souris traitée ont permis de mettre en évidence une bande intense et unique correspondant à 35 Kpb indiquant que l'ADN viral introduit dans les cellules musculaires est essentiellement extrachromosomique.

BEST AVAILABLE COPY

REVENDECATIONS

1. Utilisation de vecteurs recombinants d'origine virale, non répliquables, et susceptibles d'être reconnus par les récepteurs de cellules musculaires, humaines ou animales, infectables par ces virus, ces vecteurs étant en outre modifiés par un acide nucléique d'insertion contenant une séquence nucléotidique codant pour une séquence polypeptidique dont l'expression dans lesdites cellules musculaires est recherchée, cette séquence étant sous le contrôle d'un promoteur reconnu par les polymérases de ces cellules, pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement de pathologies affectant les cellules musculaires ou de pathologies dont la localisation dans l'organisme les rendent accessibles aux produits de l'expression de la séquence nucléotidique susmentionnée secrétés par lesdites cellules musculaires.

2. Utilisation de vecteurs selon la revendication 1, caractérisée en ce que ces vecteurs sont choisis parmi les adénovirus défectifs dont les génomes sont dépourvus de séquences essentielles nécessaires à la répllication de ces adénovirus, et plus particulièrement des transactivateurs EA et EB.

3. Utilisation de vecteurs selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que l'acide nucléique d'insertion est compris dans un génome défectif d'adénovirus comprenant néanmoins l'ensemble de celles des séquences essentielles nécessaires à l'encapsidation de ces adénovirus.

4. Utilisation de vecteurs selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'acide nucléique d'insertion est constitué de tout ou partie d'un gène sain de la dystrophine.

5. Utilisation de vecteurs selon l'une des revendications 1 à 4, pour l'obtention d'un médicament

BEST AVAILABLE COPY

REVENDICATIONS

1. Utilisation de vecteurs recombinants d'origine virale, non répliquables, et susceptibles d'être reconnus par les récepteurs de cellules musculaires, humaines ou animales, infectables par ces virus, ces vecteurs étant en outre modifiés par un acide nucléique d'insertion contenant une séquence nucléotidique codant pour une séquence polypeptidique dont l'expression dans lesdites cellules musculaires est recherchée, cette séquence étant sous le contrôle d'un promoteur reconnu par les polymérases de ces cellules, pour l'obtention d'un médicament pour l'administration par la voie intraveineuse, destiné au traitement de pathologies affectant les cellules musculaires ou de pathologies dont la localisation dans l'organisme les rendent accessibles aux produits de l'expression de la séquence nucléotidique susmentionnée sécrétés par lesdites cellules musculaires.

2. Utilisation de vecteurs selon la revendication 1, caractérisée en ce que ces vecteurs sont choisis parmi les adénovirus défectifs dont les génomes sont dépourvus de séquences essentielles nécessaires à la répllication de ces adénovirus, et plus particulièrement des transactivateurs EA et EB.

3. Utilisation de vecteurs selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que l'acide nucléique d'insertion est compris dans un génome défectif d'adénovirus comprenant néanmoins l'ensemble de celles des séquences essentielles nécessaires à l'encapsidation de ces adénovirus.

4. Utilisation de vecteurs selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'acide nucléique d'insertion est constitué de tout ou partie d'un gène sain de la dystrophine.

BEST AVAILABLE COPY

destiné au traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne.

6. Utilisation de vecteurs selon l'une des revendications 1 à 5, par voie intra-veineuse.

7. Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il est constitué du génome défectif d'un adénovirus, comprenant néanmoins l'ensemble de celles des séquences essentielles nécessaires à l'encapsidation de cet adénovirus, et dans lequel est inséré un acide nucléique recombinant dont est recherchée la diffusion dans la masse musculaire, cet acide nucléique étant placé sous le contrôle d'un promoteur susceptible d'être reconnu par les polymérases des cellules musculaires, notamment le promoteur fort de la région précoce E1A du génome des adénovirus.

8. Vecteur recombinant selon la revendication 7, caractérisé en ce que cet acide nucléique recombinant est constitué de tout ou partie du gène de la dystrophine.

9. Composition pharmaceutique comprenant un vecteur recombinant selon la revendication 7 ou la revendication 8, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

BEST AVAILABLE COPY

5. Utilisation de vecteurs selon l'une des revendications 1 à 4, pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne.

6. Utilisation de vecteurs selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 pour l'obtention de médicaments pour le traitement de maladies cardiaques, caractérisée en ce que l'acide nucléique d'insertion code pour une protéine ou un polypeptide ayant des propriétés thrombolytiques.

7. Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il est constitué du génome défectif d'un adénovirus, comprenant néanmoins l'ensemble de celles des séquences essentielles nécessaires à l'encapsidation de cet adénovirus, et dans lequel est inséré un acide nucléique recombinant dont est recherchée la diffusion dans la masse cardiaque, cet acide nucléique étant placé sous le contrôle d'un promoteur susceptible d'être reconnu par les polymérases des cellules musculaires, notamment le promoteur fort de la région précoce E1A du génome des adénovirus.

8. Vecteur recombinant selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'acide nucléique d'insertion code pour une protéine ou un polypeptide ayant des propriétés thrombolytiques.

9. Composition pharmaceutique comprenant un vecteur recombinant selon la revendication 7 ou la revendication 8, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

BEST AVAILABLE COPY

VERIFICATION OF TRANSLATION

I, Derek JARVIS

7, rue d' Upsal
67000 STRASBOURG

declare that I am conversant with the French and English languages and that to the best of my knowledge and belief the following is a true translation of the patent bearing the national registration No. 91 11947

Signature :

Derek Jarvis

Strasbourg, 8th August, 2000

RECOMBINANT VECTORS OF VIRAL ORIGIN, PROCEDURE FOR THEIR PRODUCTION AND THEIR USE FOR THE EXPRESSION OF POLYPEPTIDES IN MUSCLE CELLS

5 The invention relates to recombinant vectors of viral origin which contain a nucleotide sequence coding for a specific polypeptide, and their use for the expression of this polypeptide in muscle cells. The invention also relates to a procedure for producing these vectors, as well as to their uses, in particular as
10 medicines in the field of muscle diseases.

 The hitherto unresolved problem of the direct diffusion of a gene towards a specific tissue is an obstacle to the development of gene therapy in the field of muscle diseases.

 The various attempts to modify muscle tissue performed
15 hitherto consist mainly of that involving fusion of muscle cells with a host cell (Salminen, A et al., Hum.GeneTher. 2, 15-26 (1991); Partridge, T.A. et al., Nature 337, 176-179 (1989), and that involving direct injection of DNA into the muscles (Wolff, J.A. et al., Science 247, 1465-1468 (1991); Acsadi, G., New Biol. 3, 71-81 (1991)).

20 The method proceeding by the fusion in mice of precursors of muscle cells derived from a normal donor with muscle fibers of a host (Partridge, T.A. et al., mentioned above) has been carried out with success and this cellular therapy has been the subject of preliminary trials in children. However, this approach seems to
25 present too many disadvantages to be applicable to the treatment of muscle diseases. In fact, since the migratory capacities of the precursor cells are reduced to a few millimeters, the cellular implantation of these latter would necessitate millions of injections requiring hours of anaesthesia. Inevitably, there would be the risk
30 of immunological problems leading to rejection phenomena occurring, as in the case of many grafts. In addition, the treatment of Duchenne's muscular dystrophy (DMD) not only requires making contact with the skeletal muscles but also with the myocardial cells; the difficulties likely to be encountered in
35 implanting precursors of muscle cells in the myocardium can easily be imagined. Consequently, cellular therapy hardly seems to be appropriate for the treatment of diseased cells exhibiting such dissemination in the organism.

Gene therapy by direct in vivo introduction of nucleic acids into the interior of organs is an attractive method on account of its simplicity, but its development is confronted with a number of obstacles. In particular, the expression of genes in the muscles remains localized at the site of injection (Wolff, J.A., et al., mentioned above) and seems to be of quite limited duration, particularly in cardiac muscle (Acsadi, G. et al., mentioned above).

The aim of the present invention is precisely to make possible the introduction of a very large number of nucleic acids into a considerable number of muscle cells (up to 50% or more) of a human or animal organism, whether these muscle cells be those of skeletal muscle or even those of the myocardium.

The present invention relates more particularly to the transport of nucleic acids to target muscle cells by the blood, while protecting these nucleic acids against attack by various blood constituents.

Another objective of the present invention is to make available to the public pharmaceutical compositions which make possible the treatment of muscle diseases, and more particularly genetic diseases of the muscle system, or also diseases, the localization of which in the organism makes them accessible to the expression products of the above-mentioned nucleic acids, these products being secreted by the said muscle cells.

The present invention follows from the discovery made by the inventors of the fact that β -galactosidase activity is found in many tissues after injection into mice of recombinant vectors of viral origin, more particularly of adenoviral origin, into the genome of which the gene coding for β -galactosidase has been inserted. Such tissues include the lungs, liver, intestine, heart and the skeletal muscles. The expression of the gene for β -galactosidase is constant with time, since the proportion of blue-coloured cells (colour produced subsequent to gene expression) in the muscle tissue is more or less the same from one month to the next.

Figure 1 shows an example of the construction of a recombinant vector according to the invention and which corresponds to a type Ad5 adenovirus into the genome of which the gene for β -galactosidase has been inserted under the control of the RSV promoter.

The subject of the present invention is the use of recombinant vectors of viral origin, incapable of replication and likely to be recognized by the receptors of human and animal muscle cells which can be infected by these viruses, these vectors being additionally modified by a nucleic acid insert containing a nucleotide sequence which codes for a polypeptide sequence, the expression of which in the said muscle cells is sought, this sequence being under the control of a promoter recognized by the polymerases of these cells, for the production of a medicine designed for the treatment of either diseases affecting muscle cells or diseases whose localization in the organism makes them accessible to the expression products of the above-mentioned nucleic acids and secreted by the said muscle cells.

The adenoviruses, in particular the human adenoviruses type 2 or 5 represent particularly preferred vectors in the framework of the present invention by virtue in particular of the large size of the foreign DNA fragment which it is possible to insert into the genome of these viruses.

Advantageously, the above-mentioned nucleic acid insert is included in a defective genome of an adenovirus, this genome lacking essential sequences necessary for the replication of these adenoviruses, and more particularly the EA and EB transactivators; nonetheless, this genome preferentially includes all of those essential sequences necessary for the encapsidation of these adenoviruses.

The amount of vectors administered to the organism is advantageously chosen so as to overwhelm the immune system of the organism into which they are injected.

Advantageously, the route of administration selected in the framework of the present invention is the intravenous or intraarterial route.

Among the diseases affecting muscle cells mentioned above, mention may be made of genetic diseases such as muscular dystrophy.

Consequently, the nucleic acid inserted into the genome of the viral vector and the diffusion of which into the muscle mass is desired, comprises a nucleotide sequence coding for a polypeptide capable of treating the disease in question, and more particularly of

playing the role in the muscle cell of the polypeptide normally present in a healthy cell, but the deficiency of which is due either to an abnormally low level or the complete failure of the production of this polypeptide, or to an error in its amino acid sequence which results from genetic anomalies in its coding nucleotide sequence.

Vectors according to the invention used to produce a medicine designed for the treatment of muscular dystrophy are more particularly characterized in that the nucleic acid insert is constituted by all or part of a healthy gene for dystrophin. The introduction of the entire gene for dystrophin or even of any part of this gene which codes for a polypeptide conserving an activity similar to that of the whole protein can be carried out in accordance with a method identical with that described hereafter for the introduction of the β -galactosidase gene.

As examples of diseases other than muscle diseases, susceptible to treatment in the framework of the present invention, mention may be made of the thromboses originating from infarcts or also phlebites.

Vectors according to the invention used to produce a drug designed for the treatment of thromboses and for the prevention of infarcts and phlebites are more particularly characterized in that the nucleic acid insert comprises a nucleotide sequence coding for a thrombolytic substance. The latter sequence is advantageously preceded by a signal sequence which codes for a peptide signal which ensures the secretion of the thrombolytic substance outside the muscle cell.

The invention also relates to any recombinant vector characterized in that it is constituted of the defective genome of an adenovirus comprising, nonetheless, all of the essential sequences necessary for the encapsidation of this adenovirus, and into which is inserted a recombinant nucleic acid, the diffusion of which is desired in the muscle mass, this nucleic acid being placed under the control of a promoter capable of being recognized by the polymerases of the muscle cells, in particular by the strong promoter of the E1A early region of the genome of the adenoviruses.

A preferred recombinant vector of the invention is characterized in that this recombinant nucleic acid is constituted by all or part of the gene for dystrophin.

5 The invention also relates to pharmaceutical compositions comprising one or more recombinant vectors such as those described above, in combination with a pharmaceutically acceptable vehicle.

10 The subject of the invention is also a procedure for producing the recombinant vectors described above which comprises, after the construction stage itself of these vectors by the introduction of the nucleic acid insert into their genome, a transformation step of transformable cell lines of higher eukaryotes (in particular of human or animal origin), themselves carrying a distinct nucleotide sequence capable of complementing the part of the genome of the
15 adenovirus essential for the replication thereof and which the above-mentioned vector lacks, the said distinct sequence being preferably incorporated into the genome of the cells of the said cell line.

20 As a preferred example of such cell lines, mention should be made of line 293, a human embryonic kidney line which contains, integrated into its genome, the first eleven percent of the lefthand end of the genome of an Ad5. This portion complements defective recombinant viruses which bear deletions in this region. Such a production procedure is more particularly described in the
25 European patent application No. 0 185 573 of 20/11/85.

After transformation of these cell lines, the vectors which are thus multiplied are recovered and purified.

30 The present invention will be illustrated more particularly with the aid of the detailed description which follows of the construction of recombinant adenovirus vectors comprising the gene coding for β -galactosidase, and of the properties of this adenovirus vector.

1. Construction of the recombinant adenovirus Ad-RSV- β -gal, by means of in vivo recombination.

35 This recombinant adenovirus was constructed by homologous recombination between a suitable plasmid and the genome of a type 5 (Ad5) adenovirus. In this construction, the β -galactosidase gene is placed under the control of the RSV (Rous Sarcoma Virus)

promoter. The plasmid pAdRSV Gal used contains the PvuII segment of the lefthand end of the Ad5 (segment situated between the positions 0 and 1.3 of the plasmid in Figure 1) comprising the inverted terminal repeat, the origin of replication, encapsidation signals and the amplifier Ela. This fragment is followed by a nls lacZ gene (described in Bonnerot, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 6795-6799) which codes for β -galactosidase, and by a fragment of the adenovirus Ad5 situated between the positions 9.4 and 17 of the plasmid of Figure 1.

The values of the positions 1.3, 9.4 and 17 indicated above are units indicating the number of base pairs included within these fragments, one unit representing 360 base pairs.

The Ad5 sequence situated between the above-mentioned positions 9.4 and 17 allows recombination with the adenovirus dl324 treated with the restriction enzyme ClaI (corresponding to a deletion mutant E3; the deletion being made between the positions 78.4 and 84.3 of the genome of the adenovirus shown in Figure 1), after transfection of 293 cells (human embryonic kidney cells transformed by the adenovirus and mentioned above) in order to generate the recombinant vector Ad-RSV- β -gal. The nls lacZ gene is controlled by the RSV LTR promoter and possesses the polyadenylation signal of the SV40 virus. The recombinant virus thus obtained is incapable of replicating on account of the deletion of the E1 genes.

2. Study of the transfer of the gene to the organs of the mouse through the intermediary of the adenovirus.

Four days old Balb/C mice are given an intravenous injection of 20-40 microliters of highly purified recombinant adenovirus Ad-RSV- β -gal (10^9 plaque-forming : PFU/ml), the organs were excised 15 days after the injection and treated with 4% paraformaldehyde in a phosphate buffer for 30 minutes. After being rinsed, the organs were incubated overnight at 30°C in a X-gal solution. The whole organs were then frozen and treated appropriately so that cryosections (10 micrometers thick) could be prepared and these sections were stained with the aid of hematoxylin and eosin.

The demonstration by means of histochemical staining in the manner indicated above of β -galactosidase activity in the sections

prepared indicates the presence of the gene inserted into the adenovirus vector in the cells of the excised organs.

The macroscopic examination of the heart as well as the skeletal muscles excised from these treated mice reveals the great efficiency with which this gene transfer was made after only one injection of the recombinant adenovirus. The significance of the choice of the intravenous route resides in the fact that the viral vector is not concentrated in any particular zone of the muscle tissue but, conversely, it is favourably distributed throughout the muscle mass. The histochemical staining leads to estimates that the number of transformed cells in some zones attains 50% of the number of muscle cells present in this zone.

The expression of β -galactosidase in the myocardium as well as in the skeletal muscles is perfectly stable. It was possible to observe positive stains 15, 33, 55, 66, 90, 127 and 150 days after the injection of the recombinant adenovirus. The expression of the gene seems to be constant as a function of time since the proportion of blue cells in the muscle tissues seems to be more or less the same from one month to the next.

The analysis of isolated muscle fibers reveals that a single fiber is likely to show many "centers of expression".

Analyses by (Southern) immunoblot performed on the heart of a treated mouse have led to the demonstration of an intense and unique band at 35 kbp indicating that the viral DNA introduced into the muscle cells is essentially extrachromosomal.

CLAIMS

1. Use of recombinant vectors of viral origin, incapable of replication and capable of being recognized by the receptors of human and animal muscle cells which can be infected with these viruses, these viruses being in addition modified by a nucleic acid insert containing a nucleotide sequence coding for a polypeptide sequence, the expression of which in the said muscle cells is sought, this sequence being under the control of a promoter recognized by the polymerases of these cells for the production of a drug composition designed for the treatment of either diseases affecting the muscle cells or diseases the localization of which in the organism makes them accessible to the expression products of the above-mentioned nucleotide sequence secreted by said muscle cells.

2. Use of vectors according to Claim 1, characterized in that these vectors are selected from defective adenoviruses, the genomes of which lack essential sequences necessary for the replication of these adenoviruses, and more particularly the EA and EB transactivators.

3. Use of vectors according to Claim 1 or Claim 2, characterized in that the nucleic acid insert is included in a defective adenovirus genome comprising nonetheless all of the essential sequences necessary for the encapsidation of these adenoviruses.

4. Use of vectors according to one of the Claims 1 to 3, characterized in that the nucleic acid insert is constituted by all or part of a healthy gene for dystrophin.

5. Use of vectors according to any one of the Claims 1 to 4 for the production of a medicine designed for the treatment of Duchenne's muscular dystrophy.

6. Use of vectors according to any one of the Claims 1 to 5 by the intravenous route.

7. Recombinant vector characterized in that it is constituted by a defective genome of an adenovirus, nonetheless comprising all of the essential sequences necessary for the encapsidation of this adenovirus, and in which is inserted a recombinant nucleic acid, the diffusion of which into the muscle mass is sought, this nucleic acid being placed under the control of a promoter capable of being recognized by the polymerases of the muscle cells, in particular the

strong promoter of the E1A early region of the genome of the adenoviruses.

8. Recombinant vector according to Claim 7, characterized in that this recombinant nucleic acid is constituted by all or part of the dystrophin gene.

9. Pharmaceutical composition containing a recombinant vector according to Claim 7 or Claim 8, in combination with a pharmaceutically acceptable vehicle.

10

15

20

25

30

35

CLAIMS

1. Use of recombinant vectors of viral origin, incapable of replication and capable of being recognized by the receptors of human and animal muscle cells which can be infected with these viruses, these viruses being in addition modified by a nucleic acid insert containing a nucleotide sequence coding for a polypeptide sequence, the expression of which in the said muscle cells is sought, this sequence being under the control of a promoter recognized by the polymerases of these cells for the production of a drug composition designed for the treatment of either diseases affecting the muscle cells or diseases the localization of which in the organism makes them accessible to the expression products of the above-mentioned nucleotide sequence secreted by said muscle cells.

2. Use of vectors according to Claim 1, characterized in that these vectors are selected from defective adenoviruses, the genomes of which lack essential sequences necessary for the replication of these adenoviruses, and more particularly the EA and EB transactivators.

3. Use of vectors according to Claim 1 or Claim 2, characterized in that the nucleic acid insert is included in a defective adenovirus genome comprising nonetheless all of the essential sequences necessary for the encapsidation of these adenoviruses.

4. Use of vectors according to one of the Claims 1 to 3, characterized in that the nucleic acid insert is constituted by all or part of a healthy gene for dystrophin.

5. Use of vectors according to any one of the Claims 1 to 4 for the production of a medicine designed for the treatment of Duchenne's muscular dystrophy.

6. Use of vectors according to any one of the Claims 1 to 3 for the production of drug compositions for the treatment of cardiac diseases, characterized in that the nucleic acid insert codes for a protein or polypeptide having thrombolytic properties.

7. Recombinant vector characterized in that it is constituted by a defective genome of an adenovirus, nonetheless comprising all of the essential sequences necessary for the encapsidation of this adenovirus, and in which is inserted a recombinant nucleic acid, the diffusion of which into the cardiac mass is sought, this nucleic acid

being placed under the control of a promoter capable of being recognized by the polymerases of the muscle cells, in particular the strong promoter of the E1A early region of the genome of the adenoviruses.

- 5 8. Recombinant vector according to Claim 7, characterized in that the nucleic acid insert codes for a protein or polypeptide having thrombolytic properties.
- 10 9. Pharmaceutical composition containing a recombinant vector according to Claim 7 or Claim 8, in combination with a pharmaceutically acceptable vehicle.

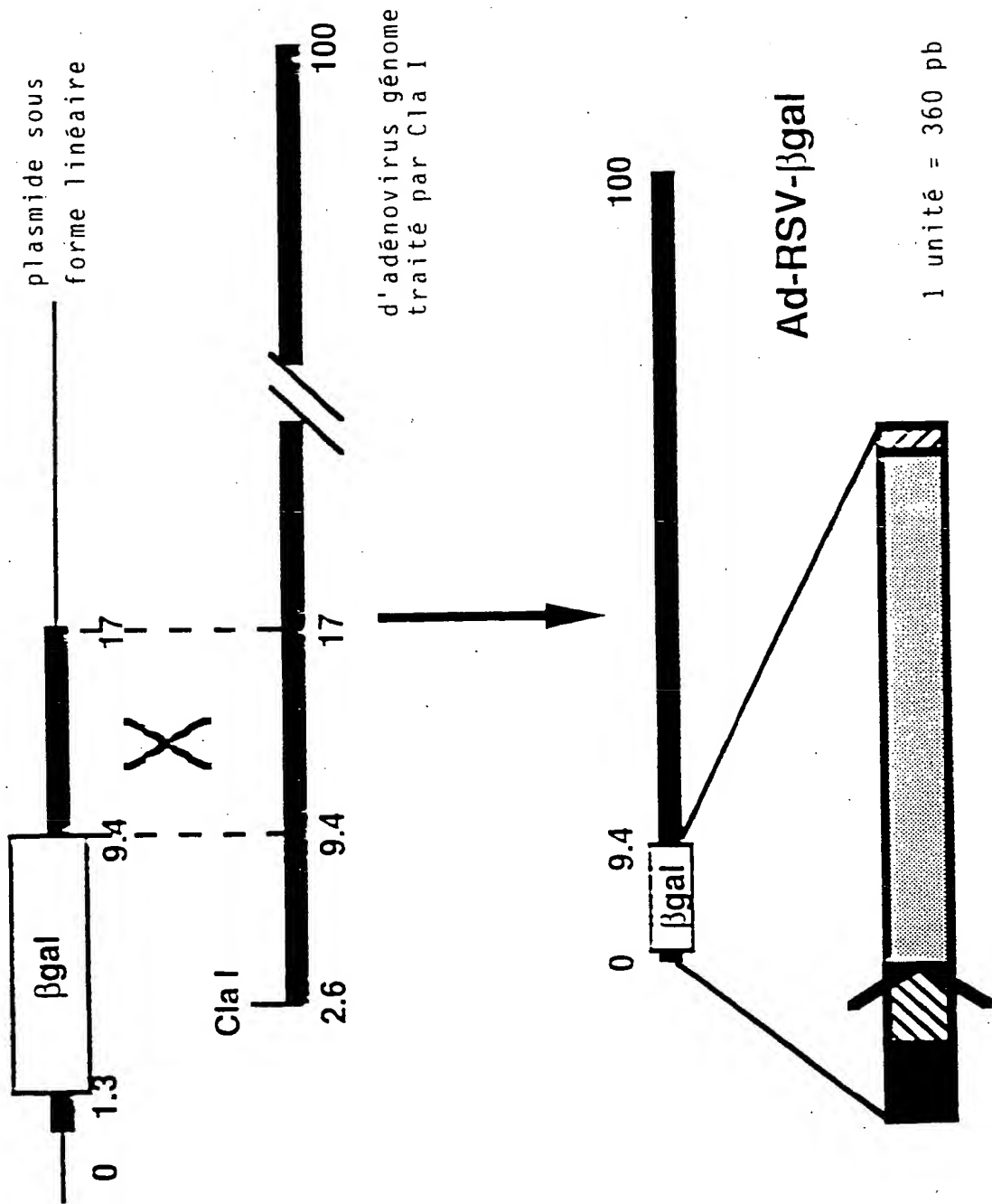


Figure 1